

VECTORIAL CLONING SYSTEM OF DNA

Patent number: EP0951539
Publication date: 1999-10-27
Inventor: BERTLING WOLF [DE]
Applicant: BERTLING WOLF [DE]
Classification:
- international: C12N15/10; C12N15/62; C12N15/66; C12N15/70;
C12N9/22
- european: C12N15/10; C12N15/62; C12N15/66; C12N15/70
Application number: EP19970953645 19971218
Priority number(s): WO1997DE02963 19971218; DE19961053498
19961220

Also published as:



WO9828415 (A1)
US6187589 (B1)
DE19653498 (C1)

BEST AVAILABLE COPY

Abstract not available for EP0951539

Abstract of corresponding document: **US6187589**

The invention relates to a vectorial cloning system consisting of a sequence of nucleotides, containing a fusion sequence and one or several restriction endonucleases, recognition sites for restriction endonucleases cutting outside their recognition sites, in addition to containing one or several other restriction endonuclease recognition sites which can be used to clone a foreign protein as well as the sequence for the desired foreign protein, wherein the foreign protein sequence is directly located on the fusion sequence after a subsequent restriction with the restriction endonucleases, followed by religation.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/10, 15/62, 15/66, 15/70 // 9/22	A1-	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/28415 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. Juli 1998 (02.07.98)
---	------------	---

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/02963 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Dezember 1997 (18.12.97) (30) Prioritätsdaten: 196 53 498.4 20. Dezember 1996 (20.12.96) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE). (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nürnberger Strasse 69/71, D-91052 Erlangen (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
--	---

(54) Title: VECTORIAL CLONING SYSTEM OF DNA

(54) Bezeichnung: VEKTOR-SYSTEM ZUR KLONIERUNG VON DNA

```

      538          540
      GAG GGA TCA ATC GAA GGA CCG ATC AGC CTC CTC GAA GCT GAG TGC ACT GAA CCG CAT GGC AGC TCG GGA CG
      TAT GCT ACT TAT TAT CCG CCG GCG TAT TCG GAG CAG GCT GAA CTC AGC TCA GCT GGC GAT CAG TCG AGC CAT GG
      Ha Gp Ser In Gln Gly Arg          542          544          546          548          550
      552          554          556          558          560          562          564          566          568          570
      T CAC GGA TCA ATC GAA GGA CCG ATC AGC CTC CTC GAA GCT GAG TGC ACT GAA CCG CAT GGC AGC TCG GGA CG
      TAT GCT ACT TAT TAT CCG CCG GCG TAT TCG GAG CAG GCT GAA CTC AGC TCA GCT GGC GAT CAG TCG AGC CAT GG
      Ha Gp Ser In Gln Gly Arg          572          574          576          578          580          582          584          586          588          590
      592          594          596          598          600          602          604          606          608          610
      T CAC GGA TCA ATC GAA GGA CCG ATC AGC CTC CTC GAA GCT GAG TGC ACT GAA CCG CAT GGC AGC TCG GGA CG
      TAT GCT ACT TAT TAT CCG CCG GCG TAT TCG GAG CAG GCT GAA CTC AGC TCA GCT GGC GAT CAG TCG AGC CAT GG
      Ha Gp Ser In Gln Gly Arg          612          614          616          618          620          622          624          626          628          630
      632          634          636          638          640          642          644          646          648          650
      T CAC GGA TCA ATC GAA GGA CCG ATC AGC CTC CTC GAA GCT GAG TGC ACT GAA CCG CAT GGC AGC TCG GGA CG
      TAT GCT ACT TAT TAT CCG CCG GCG TAT TCG GAG CAG GCT GAA CTC AGC TCA GCT GGC GAT CAG TCG AGC CAT GG
      Ha Gp Ser In Gln Gly Arg          652          654          656          658          660          662          664          666          668          670
  
```

(57) Abstract

The invention relates to a vectorial cloning system consisting of a sequence of nucleotides, containing a fusion sequence and one or several restriction endonucleases, recognition sites for restriction endonucleases cutting outside their recognition sites, in addition to containing one or several other restriction endonuclease recognition sites which can be used to clone a foreign protein as well as the sequence for the desired foreign protein, wherein the foreign protein sequence is directly located on the fusion sequence after a subsequent restriction with the restriction endonucleases, followed by religation.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Vektor-System zur Klonierung bestehend aus einer Sequenz von Nukleotiden, welches eine Fusionssequenz und eine oder mehrere Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen, die außerhalb ihrer Erkennungsstellen schneiden, zusätzlich zu einer oder mehreren weiteren für eine Klonierung eines Fremdproteins verwendbaren Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen sowie die Sequenz für das gewünschte Fremdprotein enthält, wobei durch anschließende Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen und nachfolgende Religierung die Fremdprotein-Sequenz unmittelbar an die Fusionssequenz zu liegen kommt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

VEKTOR-SYSTEM ZUR KLONIERUNG VON DNA

Die Erfindung betrifft ein Vektor-System zur Klonierung.

- 5 Gängige Vektoren, die zur Klonierung in prokaryontischen Systemen verwendet werden, enthalten in aller Regel folgende Merkmale: ein Selektionsgen, z.B. das für die Ampicillinresistenz codierende Gen, ein Markergen, das z.B. aufgrund Farbreaktion wie beim lacZ-Gen eine Unterscheidung von Vektoren mit und ohne Insert zuläßt, und vor allem ein *origin of replication*. Zum Stand der Technik ist auch auf folgende Druckschriften hinzuweisen:

- 15 a) EP 0 532 043 A2,
b) EP 0 466 332 A2,
c) EP 0 293 249 A1,
d) GB 22 12 160 A und
e) US 51 96 524.

- 20 Das Vektorsystem gemäß lit. c besteht aus einer Sequenz von Nukleotiden, die für die Expression eines Fusionsproteins codiert. Die Fremdprotein-Sequenz ist hier allerdings unmittelbar mit der Sequenz für ein Enzym verknüpft und nicht während des Klonierungsvorgangs durch weitere Strukturen getrennt.

- In Systemen, die nicht auf Plasmiden, sondern auf Phagen basieren, kommen weitere genetische Elemente hinzu, die für die Funktionen des Lebenszyklus des Phagen wichtig sind.
- 30 Wird in solchen Systemen eine fremde Sequenz in ein Markergen eingesetzt, so werden dafür gewöhnlich Schnittstellen verwendet, die im Vektor nur wenige Male bevorzugterweise nur einmal vorkommen. Eine Reihe solcher Schnittstellen ist

- gewöhnlich in einem sogenannten *multiple cloning site* angeordnet. Außer diesem *multiple cloning site* kommen in einigen Vektoren, die der Expression fremder Proteine dienen, noch weitere Elemente hinzu. In einigen Genen wird dazu eine Sequenz verwendet, die in einem Fusionsprotein mit dem zu klonierenden Insert resultiert, welches dann eine Affinität zu z.B. Maltoseresten oder Nickelchelaten hat. An diese Reste schließt sich in einigen Fällen, eine Erkennungssequenz für eine Proteinase, z.B. den Faktor Xa an. Diese Proteinase-Schnittstellen ermöglichen nach der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie ein Spalten des Fusionsproteins in den Affinitätsanteil und das eigentlich zu exprimierende Fremdprotein. Da jedoch im Anschluß an diese Proteinase-Schnittstelle in aller Regel eine *multiple cloning site*-Sequenz folgt, in die zu exprimierende Sequenz einkloniert ist, verbleiben nach dem Proteinaseprozessieren des Fusionsproteins am zu exprimierenden Fremdprotein noch weitere, oft unerwünschte Aminosäuren.
- Die meisten zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenzen liegen in einer Nukleinsäure-Umgebung vor, die eine direkte Klonierung im direkten Anschluß an eine Endoproteinase-Erkennungssequenz nicht effizient mit gängigen Klonierungsstrategien zulassen. Durch die Verwendung eines *multiple cloning site* im Anschluß (d.h. 3' von der Endoproteinase-Erkennungssequenz) an die Endoproteinase-Erkennungssequenz wird eine Klonierung von zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenzen sehr erleichtert. Nachteilig ist dabei, daß man auf Proteinebene nach einem Verdau mit dem die entsprechende Proteinsequenz erkennenden Enzym nicht das zu exprimierenden Fremdprotein gewinnt, sondern ein Fusionsprotein, das die zu exprimierende Fremdprotein-Sequenz umfaßt, mit weiteren Aminosäuren, die von den Resten der *multiple cloning site* co-

diert sind.

Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines neuen Vektorsystems zur Klonierung von Fremdproteinen, welches die Nachteile des Standes der Technik vermeidet. Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 10 gelöst. Vorteilhaft Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 - 9 und 11.

- 10 Die Verwendung des hier vorgestellten Klonierungsvektor-Systems erlaubt nun, in einem nachfolgenden Verdau- und Religationsschritt, die zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenz direkt an eine Endoproteinasen-Erkennungssequenz heranzuziehen. Dadurch ist gewährt, daß die zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenz aus einem exprimierten Fusionsprotein nach Verdau mit dem die entsprechende Proteinsequenz er-
15 kennenden Enzym ohne weitere Anteile freigesetzt wird.

- Ein besonderer Vorteil ist auch darin zu sehen, daß im Zuge des hier vorgestellten Verfahrens eine Wahl des Leserahmens frei möglich ist. Dadurch ist nicht nur ein exaktes Positionieren des zu exprimierenden Fremdgenanteils möglich, sondern auch eine Definition des Starts des Fusionsgenanteils. Um der durch den Klonierungsvorgang bedingten unerwünschten Expression zusätzlicher Peptidanteile am zu exprimierenden Fremdgen in einfacher und dennoch hochselektiver Weise vor-
25 zubeugen, wurde folgende Strategie gewählt:

- Es wurde die Erkennungssequenz für das Enzym BcgI verwendet, um es innerhalb der *multiple cloning site* zu klonieren, in die später mit beliebigen Enzymen die Fremdsequenz eingesetzt werden kann. BcgI ist eins der Enzyme, bislang das
30 einzig kommerziell erhältliche, die in einem definierten Ab-

stand (10/12 Nukleotide) von ihrer Erkennungssequenz sowohl vor als auch hinter dieser Sequenz schneiden.

Damit wird durch diesen Schnitt des Enzyms also ein Sequenz-
abschnitt $2 \times 6 + 10 + 12 = 34$ bp entfernt. Eine anschließende Religation erzeugt also Sequenzen, aus denen 34 Basenpaare entfernt sind. Im Fall einer gezielten Klonierung liegen also z.B. das letzte Nukleotid der Endoproteinase-Erkennungssequenz und das erste Nukleotid des ersten Codons des zu klonierenden Proteins unmittelbar zusammen. Beispielssequenzen sind in Beispiel 1 bei der Auflistung einiger Anwendungen aufgeführt.

Besondere Vorteile des BcgI-Systems umfassen dessen Neigung, je nach Pufferkonzentration in 10-50% der Fälle zu kleinen Deletionen (in der Regel 3 Nukleotide) an der Schnittstelle zu führen. Das bewirkt, daß in diesen Fällen dann die erste Aminosäure des zu exprimierenden Fremdproteins, in der Regel Methionin, nach dem Verdau mit dem die entsprechende Proteinsequenz erkennenden Enzym nicht mehr Bestandteil des zu exprimierenden Fremdproteins ist, das dabei freigesetzt wird.

Man erhält ein ähnliches Ergebnis, wenn man zwei Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen verwendet; die eine im oder in unmittelbarer Nähe vom Bereich einer Endoproteinase-Erkennungssequenz und eine weitere, damit ligationskompatible Erkennungsstelle, unmittelbar vor der zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenz, so daß ein Verdau mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease und anschließender Religation den Beginn der zu exprimierenden Fremdprotein-Sequenz unmittelbar an die Endoproteinase-Erkennungssequenz heranführt.

Im folgenden wird die Erfindung anhand einiger Sequenzen und Beispiele erläutert. Es zeigen

- Fig. 1 eine erste Sequenz,
5
Fig. 2 eine zweite Sequenz der multiplen Klonierungsstelle,
Fig. 3 eine dritte Sequenz am Beispiel BamHI,
10
Fig. 4 eine vierte Sequenz am Beispiel ClaI,.
Fig. 5 eine der vorhergehenden Sequenzen nach Restriktion und Religierung,
15
Fig. 6 eine fünfte Sequenz, nämlich eine Fusionssequenz, und
Fig. 7 eine sechste Sequenz, die eine BcgI-Erkennungsstelle enthält.
20

Die in Fig. 1 gezeigte erste Sequenz läßt eine Klonierung in allen drei Leserahmen zu.

- 25 1. Liegt z.B. unmittelbar vor dem ATG eines zu exprimierenden Fremdgens eine Not I oder AscI Erkennungsstelle, so kann dieses Enzym genutzt werden, das Fragment zu einem stumpfen Ende aufgefüllt werden und an das mit HincII geschnittene Ausgangs-Konstrukt kloniert werden. Das ist in Fig. 2 gezeigt.
30

2. Liegt z.B. unmittelbar vor dem ATG eines zu exprimierenden Fremdgens eine beliebige Restriktions-Erkennungsstelle,

die ein 4 Nukleotide 3'überhängendes Ende generiert, so kann dieses Enzym genutzt werden, das Fragment zu einem stumpfen Ende aufgefüllt werden und an das mit AccI geschnittene und ebenfalls aufgefüllte Ausgangs-Konstrukt kloniert werden.

5 Das ist in Fig. 3 am Beispiel BamHI gezeigt.

3. Liegt z.B. unmittelbar vor dem ATG eines zu exprimierenden Fremgens eine beliebige Restriktions-Erkennungsstelle, die ein 2 Nukleotide 3'über überhängendes Ende generiert, so

10 kann dieses Enzym genutzt werden, das Fragment zu einem stumpfen Ende aufgefüllt werden und an das mit SalI geschnittene und ebenfalls aufgefüllte Ausgangs-Konstrukt kloniert werden. Das ist am Beispiel ClaI in Fig. 4 gezeigt.

15 Nach einer anschließenden BcgI Restriktion und Religierung liegt in jedem der Fälle eine Sequenz vom in Fig. 5 gezeigten Typ vor.

Dabei folgt das erste Nukleotid der zu exprimierenden Sequenz unmittelbar auf die Xa Protease Erkennungsstelle.

20

Beispiel 1: Design des Vektorsystems.

Es wurde ein induzierbares prokaryontisches Promotorsystem verwendet, das mit IPTG induzierbare lacZ-System, wie es in dem Vektor pQE30 der Fa. Qiagen vorliegt. In diesem Vektor folgt danach als erste proteincodierende Sequenz eine Abfolge von 6 Histidin-Resten. In unserem Konstrukt schließt sich unmittelbar daran eine Schnittstelle für die Endoproteinase

25

30 Xa an. Die entsprechende fünfte Sequenz ist in Fig. 6 gezeigt.

In unserem Konstrukt folgt im Anschluß daran eine *multiple*

cloning site, die eine BcgI-Erkennungsstelle enthält. Das ist Fig. 7 gezeigt.

Da eine BcgI-Stelle in dem von uns verwendeten Ausgangsvektor ebenfalls in der für Ampicillinresistenz codierenden Region vorkommt, wurde diese dort vorkommende Schnittstelle durch in vitro Mutagenese zerstört, die Ampicillinresistenz-Eigenschaft blieb dabei erhalten.

- 10 Beispiel 2: Klonierung eines Fremdproteins, hier das Strukturprotein VP1 des Polyomavirus, in dieses Klonierungsvektor-System.

VP1 enthält eine für eine Klonierung geeignete Schnittstelle (BamHI) im Abstand von 6 Nukleotiden vor seinem Methioninstartkodon. Eine weitere für die Klonierung notwendige Schnittstelle, SphI, folgt im Abstand von 59 Nukleotiden auf seine codierende Sequenz. Das Klonierungsvektor-System ebenso wie das Konstrukt, das die VP1-codierende Region umfaßt, wurden mit den geeigneten Restriktionsendonukleasen, AccI/blunt und SphI, geschnitten. Die codierende Sequenz wurde in das so vorbereitete Klonierungsvektorsystem ligiert, transformiert und durch Wachstum in E. coli-Zellen (XL1 blue(lacIq), verhindert Expression in Abwesenheit von IPTG) amplifiziert. Größere Mengen des so hergestellten Plasmidkonstrukts wurden isoliert und aufgereinigt für die weitere Bearbeitung.

Das aufgereinigte Konstrukt wurde nun mit dem Enzym BcgI verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt und anschließend religiert und erneut in Bakterien, die für eine Expression besonders geeignet sind (RB791, ein Derivat von W3110 mit lacIqL8) transformiert und dort amplifiziert.

In drei unabhängigen Klonen wurde gefunden, daß die codierende Sequenz des VP1-Proteins, beginnend mit Methionin, unmittelbar nach der letzten Aminosäure der Faktor Xa-Schnittstelle vorkam (IleGluGlyArg).

5

In einem Klon wurde festgestellt, daß auf die Sequenz des Faktor Xa die codierende Sequenz des VP1-Proteins folgte, daß jedoch die drei Nukleotide, die für Methionin codieren, deletiert waren. Bei Wiederholung der Versuche mit weiteren Proteinen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

10

Beispiel 3: Expression eines Fremdproteins

Konstrukte, die für ein Fusionsprotein mit VP1 codierten, wurden in Bakterienzellen (RB79 1) transformiert und in einer Übernachtskultur angezogen. Aus dieser Übernachtskultur wurden Bakterienkulturen bis zu einer Dichte von ca 0,8A₆₀₀ herangezogen. Anschließend wurde durch Zugabe von IPTG eine Expression des Fusionsproteins umfassend die Histidinreste, die Faktor Xa-Erkennungsstelle und VP1, induziert. Nach 6 Stunden Induktion wurde Gesamtprotein geerntet und ein Aliquot zur Überprüfung der Induktionseffizienz auf ein Gel aufgetragen. Der Hauptteil dieser Proteinmischung wurde an eine Nickelchelate-Säule entsprechend den Angaben des Herstellers (Qiagen) gebunden und dort mit verschiedenen Puffern gewaschen. Mittels einer Lösung, die 50 mM ETGA enthält, läßt sich das Fusionsprotein aus der Säule eluieren. In unserem Fall wurde jedoch durch anschließenden Verdau unter Zugabe der Endoprotease Faktor Xa das reine Expressionsprotein VP1 freigesetzt.

20
25
30

Patentansprüche

1. Ein Vektor-System zur Klonierung bestehend aus einer Sequenz von Nukleotiden, welches
5 eine Fusionssequenz (1)
und eine oder mehrere Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen (2), die außerhalb ihrer Erkennungsstellen schneiden,
zusätzlich zu einer oder mehreren weiteren für eine
10 Klonierung eines Fremdproteins verwendbaren Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen (3) sowie die Sequenz für das gewünschte Fremdprotein enthält,
wobei durch anschließende Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen (2) und nachfolgende Religierung die
15 Fremdprotein-Sequenz unmittelbar an die Fusionssequenz (1) zu liegen kommt.
2. Vektor-System gemäß Anspruch 1, wobei die Fusionssequenz (1) eine Endoproteinase-Erkennungssequenz codiert.
20
3. Vektor-System gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei bei der Verwendung von mehreren Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen (2) diese vom gleichen oder isoschizomeren Enzym erkannt werden.
25
4. Vektor-System gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die Restriktionsendonukleasen-Erkennungsstellen (2) zwei unterschiedliche, aber ligationskompatible Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen sind.
30
5. Vektor-System gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei nur eine Restriktionsendonuklease-Erkennungsstelle (2) mit zwei Schnittstellen vorliegt.

6. Vektor-System nach Anspruch 5, wobei die Restriktions-
endonuklease-Erkennungsstelle (2) eine Erkennungsstelle für
BcgI ist.

5

7. Verwendung eines Vektor-Systems gemäß einem der An-
sprüche 1-6 zur Klonierung von Fremdproteinen.

8. Kit zur Klonierung von Fremdproteinen, enthaltend ein
10 Vektor-System gemäß einem der Ansprüche 1-6.

9. Verfahren zur Klonierung von Fremdproteinen unter Ver-
wendung eines Klonierungsvektor-Systems gemäß einem der An-
sprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-
15 Sequenz für das gewünschte Protein in eine multiple Klonie-
rungsstelle (3) inseriert wird, die der Fusionssequenz (1)
benachbart ist, und durch anschließende Restriktion mit der
Restriktionsendonuclease (2) und nachfolgende Religierung
die Fremdproteinsequenz unmittelbar an die Fusionssequenz
20 (1) zu liegen kommt und anschließende Expression des Fusi-
onsproteins.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß
nach der Expression des Fusionsproteins das gewünschte Pro-
25 tein durch Spaltung des Fusionsproteins an einer am Ende der
Fusionssequenz (1) lokalisierten Endoprotease-Schnittstelle
erhalten wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß
30 durch Verwendung von BcgI als Restriktionsendonuclease (2)
am gewünschten Protein die N-terminale erste Aminosäure de-
letiert ist.

Fig. 2

SfII RsrII
 5' CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC AT | C AGC CTG GTC CGA GCT GAG TGC AGT CGG CCG CAT | GNN NNN
 3' CTC CCT AGT TAG CTC CCG GCG | TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCC GGC G | TA CNN NNN
 His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa
BcgI
 (HincII)
 (NotI)

Fig. 2

5' CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC AT | C AGC CTG GTC CGA GCT GAG TGC AGT CGG ATC CAT | GNN NNN
3' GTG CCT AGT TAG CTC CCG GCG | TAG TCG GAC CAG CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCC TAG G | TA CNN NNN
His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa
SfiI RsrII BcgI (HincII) (BamHI)

Fig. 3

SfiI RsrII
5' CAT GGA TCA ATC GAA GGA CGC AT | C ACC CTC CTC CGA CCT CAC TGC AGT CGA CGA TAT | GNN NNN
3' GCG CCT AGT TAG CTC CCG CGG | TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA CGT TAG A | TA CNN NNN
His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa
BcgI (HincII) (ClaI)

Fig. 4

Fig. 5

5' CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC ATG NNN
 3' GTA GTG GTA GTG GTA GTG CCT AGT TAG CTC CCG GCG TAC NNN
 His His His His His His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Met
 SfiI RsrII XaI

Fig. 6

5' CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC
 3' GTA GTG GTA GTG GTA GTG CCT AGT TAG CTC CCG GCG
 His His His His His His Gly Ser Ile Glu Gly Arg
 --Xa

Fig. 7

5' CAC GGA TCA ATC GAA GGA CGC AT C AGC CTG GTC CGA GGT GAG TGC AGT CGA CCG CAT GCG AGC TCG GTA CC
 3' GTG CCT AGT TAG CTC CCG GCG TAG TCG GAC CAG GCT CGA CTC ACG TCA GCT GGC G TA CCG TCG AGC CAT GG
 His Gly Ser Ile Glu Gly Arg Xa Bgl HIincII SphI SacI KpnI

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internet Application No
PCT/DE 97/02963

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/10 C12N15/62 C12N15/66 C12N15/70 //C12N9/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 532 043 A (HITACHI LTD) 17 March 1993 cited in the application see the whole document	1-11
A	P. MARKMEYER ET AL.: "The pAX plasmids: new gene-fusion vectors for sequencing, mutagenesis and expression of proteins in Escherichia coli" GENE, vol. 93, no. 1, 1 September 1990, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, pages 129-134, XP002065733 see the whole document	1-11
A	EP 0 466 332 A (NEW ENGLAND BIOLABS INC) 15 January 1992 cited in the application see the whole document	1-11
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 May 1998

Date of mailing of the international search report

08/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/DE 97/02963

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 293 249 A (AMRAD CORP LTD) 30 November 1988 cited in the application see the whole document _____	1-11
A	EP 0 161 937 A (CELLTECH LTD) 21 November 1985 see the whole document _____	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/02963

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0532043 A	17-03-1993	JP 5068557 A	23-03-1993
		DE 69220306 D	17-07-1997
		DE 69220306 T	11-12-1997
EP 0466332 A	15-01-1992	US 5200336 A	06-04-1993
		DE 69105377 D	12-01-1995
		DE 69105377 T	06-07-1995
		DE 466332 T	03-02-1994
		JP 6339374 A	13-12-1994
EP 0293249 A	30-11-1988	AU 607511 B	07-03-1991
		AU 1793288 A	21-12-1988
		WO 8809372 A	01-12-1988
		CA 1338903 A	11-02-1997
		DE 3873989 A	01-10-1992
		DK 38189 A	27-01-1989
		ES 2045115 T	16-01-1994
		JP 6081596 B	19-10-1994
		JP 1503441 T	22-11-1989
		NO 178894 B	18-03-1996
		US 5654176 A	05-08-1997
EP 0161937 A	21-11-1985	AU 585857 B	29-06-1989
		AU 4247485 A	21-11-1985
		DE 3586750 A	19-11-1992
		DK 217985 A	17-11-1985
		GB 2160206 A,B	18-12-1985
		JP 1973695 C	27-09-1995
		JP 7004253 B	25-01-1995
		JP 61135591 A	23-06-1986

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/02963

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/10 C12N15/62 C12N15/66 C12N15/70 //C12N9/22

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 532 043 A (HITACHI LTD) 17.März 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-11
A	P. MARKMEYER ET AL.: "The pAX plasmids: new gene-fusion vectors for sequencing, mutagenesis and expression of proteins in Escherichia coli" GENE, Bd. 93, Nr. 1, 1.September 1990, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Seiten 129-134, XP002065733 siehe das ganze Dokument	1-11
A	EP 0 466 332 A (NEW ENGLAND BIOLABS INC) 15. Januar 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-11
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"a" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Mai 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

08/06/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Hornig, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/DE 97/02963

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 293 249 A (AMRAD CORP LTD) 30.November 1988 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-11
A	EP 0 161 937 A (CELLTECH LTD) 21.November 1985 siehe das ganze Dokument -----	1-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/DE 97/02963

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0532043 A	17-03-1993	JP 5068557 A	23-03-1993
		DE 69220306 D	17-07-1997
		DE 69220306 T	11-12-1997
EP 0466332 A	15-01-1992	US 5200336 A	06-04-1993
		DE 69105377 D	12-01-1995
		DE 69105377 T	06-07-1995
		DE 466332 T	03-02-1994
		JP 6339374 A	13-12-1994
EP 0293249 A	30-11-1988	AU 607511 B	07-03-1991
		AU 1793288 A	21-12-1988
		WO 8809372 A	01-12-1988
		CA 1338903 A	11-02-1997
		DE 3873989 A	01-10-1992
		DK 38189 A	27-01-1989
		ES 2045115 T	16-01-1994
		JP 6081596 B	19-10-1994
		JP 1503441 T	22-11-1989
		NO 178894 B	18-03-1996
		US 5654176 A	05-08-1997
EP 0161937 A	21-11-1985	AU 585857 B	29-06-1989
		AU 4247485 A	21-11-1985
		DE 3586750 A	19-11-1992
		DK 217985 A	17-11-1985
		GB 2160206 A,B	18-12-1985
		JP 1973695 C	27-09-1995
		JP 7004253 B	25-01-1995
		JP 61135591 A	23-06-1986

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.